我國植物檢防疫線蟲之偵測鑑識現況與挑戰

謝孟珊 [1]　楊爵因 [1,*]

[1] 國立臺灣大學植物病理與微生物學系。台灣 台北市。

摘要

植物線蟲種類繁多，物種間之型態、生物特性與生態地位皆具有豐富的多樣性。其體型微小、繁殖力強、環境適應力強，具有容易隨貿易貨品移動的特性，且入侵一地區之後不易完全滅除，每年對全球重要農業作物造成嚴重產量減損、森林損失以及景觀地貌之變化，為影響國際貿易甚鉅的重要生物因子。我國為世界貿易組織會員國，自國外輸入之農產品種類與數量眾多，有害生物隨之入侵之風險亦高。現行中華民國輸入植物或植物產品檢疫規定中，稻莖線蟲、穿孔線蟲、黃金線蟲為禁止輸入部分植物或植物產品之原因，而莖線蟲、馬鈴薯腐敗線蟲之相關寄主植物或植物產品則為有條件輸入。此外，我國管制有害生物清單列有其他 54 種線蟲。於邊境，防檢局對輸入植物或其產品進行抽樣，對攔截到之有害生物進行偵測鑑定。當確認有害生物之種類時，立即採取適當之檢疫措施。本文回顧相關法源規範，簡介重要線蟲種類、偵測鑑識技術，並檢視我國現行之制度。針對具有檢防疫重要性的植物線蟲，目前我國主要採用型態鑑定與分子技術鑑定併行的鑑定方式。然而，受限於諸多重要生物學資訊、資源、人力的不完整性，欲快速且準確完成植物線蟲鑑定實屬不易。未來，我國須儘速進行大量專業人才的培育以補足人力缺口，並提升各單位儀器設備等級與數量，並積極進行植物線蟲鑑識新技術之開發與應用，以確保具檢防疫重要性之植物線蟲鑑識效能。

關鍵詞: 植物檢疫、植物寄生線蟲、偵測鑑定技術

*論文聯繫人
E-mail: jiueinyang@ntu.edu.tw

前言

以植物組織作為營養來源的線蟲，俗稱為植物寄生線蟲 (plant parasitic – nematodes) 或植物線蟲 (plant nematode)。全球已被描述的植物線蟲種類超過 4000 種，生物學歸類分屬於動物界 (Animalia)、蛻皮動物總門 (Ecdysozoa)、線蟲門 (Nematoda) 中的 4 個類群(clade)：Clade 1 (Triplonchida)、Clade 2 (Dorylaimida)、Clade 10b (Aphelenchoidea)、Clade 12 (Tylenchida)。物種間之型態、生物特性與生態地位具有相當豐富的多樣性。植物線蟲侵害寄主植物的根、莖、葉、芽、種子等部位，輕則影響寄主生長發育，產生殘根、異常增生等病徵，重則導致植株矮化、黃化、萎凋、花器葉化、不產果或果實品質不佳，甚至死亡。植物線蟲每年對全球重要農業作物造成 10–20% 產量減損，亦可於短時間內導致大面積森林木材損失及景觀地貌之變化，保守估計導致超過 1 億 5 千萬美元的直接經濟損失 (Abad *et al.* 2008)。由於植物線蟲體型微小、繁殖力強、環境適應力強，具有容易隨貿易貨品移動的特性，且入侵一地區之後之經濟損害風險極高又不易完全滅除，使其為世界各國持續共同關切的議題，為影響國際貿易甚鉅的重要生物因子。

相關法源與規範

我國為世界貿易組織 (World trade organization，WTO) 的會員國，貿易遵循該組織的「食品安全檢驗與動植物防疫檢疫措施協定」(Agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures, SPS 協定)，故對於輸入農產品採行之檢疫與檢驗措施必須有客觀依據，不得依主觀認定來採行武斷或恣意的貿易限制措施。SPS 協定中，明訂會員應以國際植物保護公約 (International plant protection convention, IPPC) 組織所訂定之國際植物防疫檢疫措施標準 (International standard of phytopathology measures，ISPMs) 為基礎來制定其植物防疫檢疫措施。截至 2021 年底止，在植物防疫檢疫訂有 45 種 ISPM (惟 ISPM 30 已於 2018 年撤銷，併入 ISPM 35)。其中，ISPM 第 15 號標準說明減少國際貿易中木質包裝材料移動所帶來的檢疫有害生物傳入和傳播風險的植物檢疫措施，包括使用去樹皮木材和採取檢疫處理措施，並訂定處理標識。ISPM 第 27 號標準則描述管制有害生物診斷方法，提供與國際貿易相關之管制有害生物的官方診斷鑑定程序和方法。陸續於 2015、2016、2017 年，IPPC 所公告增加的 ISPM 27 附件 8、9、10、11、17、18，分別提供對於重要植物線蟲的詳細指引：*Anguina* spp. (附件 18)、*Aphelenchoides besseyi* (附件 17)、*Aphelenchoides fragariae* (附件 17)、*Aphelenchoides*

ritzemabosi (附件 17) 、*Bursaphelenchus xylophilus* (附件 10) 、*Ditylenchus dipsaci* (附件 8) 、*Ditylenchus destructor* (附件 8)、*Xiphinema Americanum sensu lato* (附件 9)。

基於 WTO–SPS 協定，我國於 85 年 1 月 10 日由總統公布施行「植物防疫檢疫法」，行政院農業委員會 (簡稱農委會) 於 85 年 11 月 30 日發布公告「中華民國臺灣地區應實施防疫之特定疫病蟲害種類」，86 年 9 月 17 日發布「植物防疫檢疫法施行細則」，86 年 12 月 10 日發布「植物防疫及檢疫執行辦法」。依植物防檢疫法第十條第一項之規定，農委會於 87 年 6 月 29 日發布「疫區植物或植物產品土壤及其包裝容器栽培介質遷移核准辦法」，明定主管機關得劃定疫病蟲害疫區，限制或禁止植物、植物產品、土壤及其包裝、容器、栽培介質之遷移，以防止特定疫病蟲害之蔓延。依植物防疫檢疫法十四條第一項之規定，農委會於 87 年 7 月 31 日公告禁止輸入或轉運國內之特定植物或植物產品，並依第十六條第二項規定，公告植物或植物產品輸入檢疫條件。於 88 年 4 月 22 日公告「中華民國輸入植物或植物產品檢疫規定」，後依該法規定和實務需要，陸續增修訂各別疫病蟲害檢疫條件。103 年 6 月 18 日修正植物防疫檢疫法第十四條及第十六條，檢疫措施法源配合修正，故現禁止輸入和檢疫條件法源分別為該法第十四條第一項第一款和第二款。此外，因應 ISPM 第 15 號之規範，農委會於 97 年 6 月 2 日公告訂定「輸入貨品使用之木質包裝材料檢疫條件」，規定處理方式和章戳。防檢局亦於 97 年 8 月 14 日訂定「輸入貨品使用之木質包裝材料檢疫作業要點」，規定執行檢疫時的作業規範。於 97 年 10 月 9 日，「中華民國臺灣地區應實施防疫之特定疫病蟲害種類」法令名稱修正為「中華民國應施防疫之特定疫病蟲害種類」，於 106 年 5 月 23 日再度修正為「中華民國植物特定疫病蟲害種類及範圍」，相關內容亦從列出指定國外發生而國內未有的病蟲害，調整為公告為國內已發生的病蟲害，並就其危害作物與地區增列範圍，以落實中央及地方主管機關就特定疫病蟲害監測或調查及後續防治等事項分工。

現行 110 年 11 月 8 日所修訂之中華民國輸入植物或植物產品檢疫規定中，稻莖線蟲 (*D. angustus*)、穿孔線蟲 (*Radopholus similis*; syn. *R. citrophilus*) 、 黃金線蟲 (*Globodera rostochiensis*) 為禁止輸入部分植物或植物產品之原因，而莖線蟲 (*D. dipsaci*)、馬鈴薯腐敗線蟲 (*D. destructor*) 之相關寄主植物或植物產品，則須依照「有條件輸入植物或植物產品」相關檢疫條件辦理。此外，我國管制有害生物清單列有 54 種線蟲。依據植物防疫及檢疫執行辦法，輸入之植物或植物產品經檢疫結果證明有該列有害生物存在時，應經適當之檢疫處理，確定該有害生物完全滅除後，始得輸入。無適當之檢疫處理方式可滅除該有害生物時，即予退運或銷

燬，且防檢局得對有害生物之上一分類群 (Taxa) 有害生物採取檢疫處理措施。

重要植物線蟲

1、穿孔線蟲 (*Radopholus similis; syn. R. citrophilus*)

穿孔線蟲廣泛分布於熱帶、亞熱帶地區 (EPPO 2022)，為內寄生潛移性線蟲，其幼蟲所有齡期與雌蟲都具有侵染寄主的能力。其具強而有力的口針，可穿刺侵入寄主根部細胞，佔據皮層薄壁組織細胞間隙位置，以口針吸取鄰近細胞之細胞質，最後破壞該細胞並造成空洞化。線蟲持續移動、取食細胞組織，導致空洞持續擴大，導致寄主呈現典型紅褐色病癥 (Valette *et al.* 1998)。植株受到其侵染後根部虛弱，故易導致植物倒塌或連根拔起等病徵。穿孔線蟲寄主廣泛，可侵染超過 350 種植物，包含香蕉、柑橘、胡椒、火鶴花、甘蔗等重要經濟作物，導致香蕉倒伏病 (banana toppling–over disease) 、胡椒黃化病 (pepper yellows disease) 與柑橘猝死症 (spreading decline of citrus) 等。於嚴重感染區域，穿孔線蟲可導致香蕉倒伏、高達 80%的柑橘減產以及胡椒植株死亡。穿孔線蟲約 20–25 天可完成一次生活史，行兩性交配，雌蟲可連續數週每天產卵 4–5 顆，於土壤中可存活長達 6 個月。地處於亞熱帶、熱帶交界的臺灣，具有適合穿孔線蟲繁殖的氣候，且大面積栽培其寄主植物。過往有不慎入侵導致啟動緊急撲滅程序之事件，若穿孔線蟲線蟲族群不慎立足，恐造成我國農業嚴重經濟損失。

2、馬鈴薯包囊線蟲 (黃金線蟲，*Globodera rostochiensis*)

馬鈴薯黃金線蟲廣泛的分布於種植馬鈴薯的溫帶氣候地區與少數熱帶國家的高緯度區域，為內寄生固著型線蟲。線蟲於二齡幼蟲時期由根尖側面進入植物，後穿越數層細胞抵達維管束形成層的位置，透過口針將其食道腺所分泌的酵素等物質注入目標細胞，形成特化的合胞體 (syncytium) 為取食位點，並於內取食發育至成蟲。馬鈴薯包囊線蟲主要寄生於茄科，寄主包含馬鈴薯、番茄、茄子等 90 種植物。該線蟲會導致受侵染的作物生長不良，地上部出現葉片萎黃、植株矮小，同時使根系發育不良，塊莖或果實變小、產量下降。受感染的植株亦會增加對於病原性真菌 *Verticillium* spp.的感病性。幼蟲侵染寄主後約 38–45 天可生長成為成蟲，約 50 天完成交配，一隻雌蟲可產卵 500 顆 (Grainger 1964; Spears, 1968 ; Evans 1970) 。雌蟲於死亡後能將蟲體轉變為革質化的包囊 (cyst) ，以保護子宮內未孵化的卵，能休眠於內度過不良的外在環境，長達 28 年 (Grainger 1964)。台灣無此線蟲的發生紀錄。

3、莖線蟲屬 (*Ditylenchus angustus, D. dipsaci, D. destructor, D. myceliophagus*)

莖線蟲屬內有 81 種線蟲，多數種類為取食真菌的腐生性線蟲。然而，有三種能寄生重要糧食與經濟作物，於國際間被視為重要植物檢疫線蟲：稻莖線蟲 (*D. angustus*)、馬鈴薯腐敗線蟲 (*D. destructor*)、與莖線蟲 (*D. dipsaci*)。此外，*D. myceliophagus* 為蕈菇類產業的重要病原害蟲。這些具有植物寄生能力的種類，多以潛移型內寄生的方式寄生於植株地上部或地下部的組織，包含根、匍匐根、塊莖、走莖等；僅 *D. angustus* 以外寄生的方式取食。該屬線蟲於植物組織內行兩性交配，並產卵於植株內；每隻雌蟲可產 200–500 個卵 (Goodey 1922)。依寄主與環境之差異，其生活史可能介於 17–39 天 (Yuksel 1960; Stoyanov 1964; Zakrzewski 1977)。出卵後的每個齡期皆能侵害寄主，然而四齡幼蟲具有耐乾旱且進入休眠的能力；於土壤中，可休眠可長達 10 年 (Hooper 1984)。線蟲的交配、的取食寄主薄壁組織，導致細胞壁的中間層破裂，受感染的植物地上部常見植株矮化、異常腫脹、節間縮短、變形、壞疽、莖基部腐爛或壞死等病徵，甚至死亡 (Netscher & Sikora 1990; Sikora & Greco 1990)。

D. dipsaci 為造成嚴重作物危害的線蟲物種之一，寄主包含甜菜、洋蔥、燕麥、裸麥、玉米、草莓、萵苣、紅苜蓿、花卉球莖、四季豆、蒜等超過 500 種的植物。嚴重感染時通常導致 60–80% 的減產。該線蟲的經濟閥值相當低，每 500 克土壤中僅需 10 隻即能造成嚴重危害。此外，該屬線蟲為病原細菌 *Corynebacterium insidiosum* 之傳播媒介，且能破壞原有植物對該病原之抗性 (Hawn 1963; Hawn & Hanna 1967)。該線蟲較喜低溫環境，於 1–25 °C 間生長與繁殖，出卵後皆能危害寄主，唯其四齡幼蟲具有抵抗乾旱且進入休眠特性，故易隨低溫冷藏的貿易貨品移動而危害輸入國之農作物。*D. destructor* 主要危害馬鈴薯、甘藷和花卉球莖等 120 種寄主，能取食超過 40 屬、70 種的真菌，且可在 5–34 °C 間生長與繁殖，是國際間相當重視且受到高度監控的檢疫線蟲。寄主初期被感染時可見小白點，後漸深轉灰或成深棕或黑色，且組織呈現海綿狀質感。於嚴重感染的塊莖組織可見些微凹陷、龜裂且薄如紙的表面，且易發生真菌、細菌、蟎、其他線蟲等其他病原或害蟲的二次感染。受到感染的塊莖，於儲藏時易出現皺縮與乾或濕的腐敗病徵。地上部組織被感染時，常見矮化、莖部分支變粗，葉褪色、捲曲、發育不良等病徵。*D. angustus* 分佈於亞洲和非洲的水稻種植區域，最適生存於 20–30 °C 之間。其以外寄生的方式危害 Oryza 科的幼嫩植物組織，水稻為其主要寄主，是「水稻烏夫拉病 (Ufra disease of rice) 」的病原。該病害平均導致 30%的損失，於泰國造成 20–90 %的減產，於印度則造成高達 50%的減產 (Hollis & Keonboonrueng 1984)。於環境潮濕時，線蟲可自土壤沿著莖部移動到生長點，後以葉鞘內、稻穗、花序等部位發育中的組織為

食。於環境乾旱或植株成種子熟時，蟲體捲曲進入休眠，至多可於乾旱狀態中靜待 15 個月。於被感染初期，水稻幼苗的最上位葉可見褪色或白線，後轉淺綠色，且中肋黃化、偶爾加粗。葉片扭曲、變形，且經常具有波浪狀邊緣。重度感染時，稻穗包覆於葉鞘、受影響的莖部分支 (swollen ufra)，或是花序呈現深棕色、除尖端之外稻穗不稔 (ripe ufra)。嚴重感染時，植株呈現生長延遲、嚴重矮化、葉片萎凋，甚至死亡 (Singh & Garg 1949; Singh 1953; Prasad *et al.* 1987)。水稻為臺灣重要的糧食作物，故需防範該線蟲入侵臺灣。

4、葉芽線蟲屬 (*Aphelenchoides besseyi*、*A. fragariae*、*A. ritzemabosi*)

葉芽線蟲屬內計有 197 種線蟲，多數種類為取食真菌的腐生性線蟲，少數葉芽線蟲具有植物寄生性，可以內寄生或外寄生的方式取食，造成水稻白尖病、草莓縮葉病、菊花葉枯病等重要作物病害。於防檢疫具有重要性的種類包含，水稻葉芽線蟲 (*A. besseyi*)、草莓葉芽線蟲 (*A. fragariae*)、菊花葉芽線蟲 (*A. ritzemabosi*)，以及為蕈菇類產業的重要病原害蟲 *A. composticola*。該屬線蟲寄生植物內部時，取食葉脈間葉肉組織，受侵染部位呈現水浸狀或油狀斑點，後轉為黑褐色壞疽，終呈現乾枯、薄質而崩落。當其於外部取食，則經常躲藏於寄主葉鞘、花苞等部位，導致葉片呈現杯狀或不規則形變，下位葉可見壞疽塌陷角狀斑點，花器畸形縮小，嚴重者葉片乾枯下垂，植株生長停滯、扭曲、矮化等病徵。該屬線蟲喜好水分充足且溫暖的環境，具有良好的脫水殘存能力，使蟲體能以休眠的方式度過沒有寄主或乾燥的時期。大部分的葉芽線蟲種類透過兩性交配生殖，少數種類可孤雌生殖。該屬線蟲主要透過植物繁殖體傳播，少數則隨土壤與栽培介質。*A. besseyi* 普遍分布於我國，寄主包含我國重要出口作物山蘇，以及常見花卉、觀賞作物十數種。水稻白尖病對稻作的減損率為 10 至 30 %，高感受性品種甚至達 47% (洪 1959; 陳 1961)。苗栗地區的草莓園，偶爾可見 *A. fragariae* 造成葉片皺縮、產量下降，甚至導致植株萎凋。

5、松材線蟲 (*Bursaphelenchus xylophilus*)

松材線蟲侵害松科植物地上部，是松樹委凋病 (pine wilt disease) 的病原。其主要倚賴松斑天牛 (*Monochamus alternatus*)、長角卡羅納天牛 (*M. caroliensis*) 等天牛科昆蟲進行傳播，以兩性交配的方式繁殖，生活史短。松材線蟲於三齡幼蟲時期隨媒介昆蟲傳播，於寄主內蛻皮為四齡幼蟲，迅速進入松脂管中取食 (Stamps & Linit 1998)。被感染的松樹分泌過多過氧化脂質至周圍的木質部，造成堵塞，進而使枝條枯萎。夏季受松材線蟲嚴重感染的植株，於數十天內即可死亡。該線蟲可透過受感染的木材或木製品傳入其他國家 (Nickle *et al.* 1981)，入侵立足後之不易

移除，且會導致相當高的經濟損失，因此諸多國家將其列為重要檢疫線蟲。我國北部地區有松材線蟲之分佈。

6、根瘤線蟲屬 (*Meloidogyne* spp.)

根瘤線蟲屬為行孤雌生殖的內寄生固著型線蟲。其寄主作物超過 3000 種，包含茄科、十字花科、葫蘆科、豆科、禾本科等重要經濟作物，且廣泛分佈於全世界，每年造成全球農業濟損失超過數十億美元 (Elling 2013)。受根瘤線蟲侵染之根系，會出現明顯結瘤、腫大，影響養分和水分的吸收，使植物發育不良，產生矮化、葉片褪綠黃化，甚至萎凋 (Perry 2009)。根瘤線蟲自卵孵化之二齡幼蟲侵入植物後，會移動至維管束內適當位置後固著，藉由分泌致病因子刺激周圍寄主植物組織的不正常分化，形成巨大細胞 (giant cell)，作為線蟲獲取養分來源的取食點 (Castagnone–Sereno *et al.* 2013)。該屬內有 61 種線蟲，南方根瘤線蟲 (*M. incognita*)、北方根瘤線蟲 (*M. hapla*)、爪哇根瘤線蟲 (*M. javanica*)、花生根瘤線蟲 (*M. arenaria*) 等為全球廣泛分佈的種類。近年，喜高溫環境的象耳豆根瘤線蟲 (*M. enterolobii*) 與衣索比亞根瘤線蟲 (*M. ethiopica*) 等種類亦受到國際間重視。象耳豆根瘤線蟲已入侵我國，其能克服帶有 Mi 基因的抗病番茄植株並造成危害，並於溫室試驗中造成小白菜、洋香瓜等重要經濟作物品質大幅降低與減產，甚至在 35 °C 的高溫環境條件中加速繁殖。我國尚未有紀錄但在南美洲及非洲廣泛存在的衣索比亞根瘤線蟲，寄主範圍相當廣泛，能寄生超過 80 種植物，包含奇異果、甜菜、高麗菜、辣椒、西瓜、大豆、番茄、馬鈴薯、葡萄、以及樹木和雜草等 (Carneiro *et al.* 2003, 2007; Sirca *et al.* 2004)。

7、根腐線蟲屬 (*Pratylenchus* spp.)

根腐線蟲屬共 70 種線蟲，為內寄生遷移性線蟲，以植物的根部皮層細胞為食 (Davis & MacGuidwin 2000)。三分之二的根腐線蟲種類為孤雌生殖，每隻雌蟲產卵至多 35 顆，依環境溫度條件大約 3–8 週可完成一次生活史 (Turner & Chapman 1972; Towson & Lear 1982; Pablo & Nicola 2007)。該屬線蟲廣泛分布於全球，普遍危害咖啡、豆科、草莓、花生等蔬菜水果類高經濟價值作物，也有嚴重危害香蕉、玉米、小麥、大豆、馬鈴薯等糧食作物的報導。*P. thornei* 於美國曾導致 70 % 小麥減產 (Smiley 2009)，於澳大利亞東部亦則曾導致 380 億美元的損失 (Whish *et al.* 2014)。於我國紀錄有 6 種根腐線蟲，玉米、茶、山藥及草莓等皆為其嗜好寄主 (曾等 2019)。受到根腐線蟲危害的植株，根部皮層與鄰近細胞受到破壞導致根部紅棕色的壞疽，地上部則呈現委凋、葉片黃化、枝葉稀疏等生長不良病徵。壞疽部位易有真菌、細菌等其他病原的二次感

染 (Nyczepir & Becker 1998)。該屬線蟲具有 50%的冬季休眠比例，使其能存活於土壤中 (Kimpinski & Dunn 1985)。

植物線蟲偵測鑑識技術

多數植物線蟲個體為短於 2 mm 的梭狀、不具外骨骼、身體透明、器官清晰可見，故基礎的物種鑑識得以型態特徵為主要依據。鑑定時，運用光學 (解剖、複式) 或掃描式電子顯微鏡，毋需染色即可觀察蟲體各器官位置、形狀特徵，並進行顯微量測取得重要特徵之數據，如體長、體寬、食道腺長、雌蟲陰門及雄蟲交接刺於身體之相對位置、口針長度等特徵數據。後續檢索曾被報導之線蟲物種於文獻與資料庫 (如 NEMAPLAX)，檢視其特徵描述、對照相關圖片、照片，並參考第曼公式 (de Manian formula) 所列之各項指標 (de Man 1876, 1880)，以及特定物種之檢索表。最終，經過綜合判斷，得以完成線蟲物種鑑定。若是要檢查躲藏於植株內部的線蟲，或是欲針對部分線蟲種類於特定齡期所具有的非梭狀型態進行觀察，則可運用簡單的染色步驟，以特定染劑進行蟲體染色予以輔助。此外，運用生物化學方法偵測蛋白質酵素表現的技術，在植物線蟲鑑定方面的應用亦已久 (Esbenshade & Triantaphyllou 1985)。搭配雙向凝膠電泳 (two–dimensional gel electrophoresis)，脂酶是常被使用於根瘤線蟲屬內物種鑑識的酵素標記 (Esbenshade & Triantaphyllou 1990)。近年，學者亦利用基質輔助雷射脫附游離法 (matrix–assisted laser desorption/ ionization，MALDI)，以激發光能量吸收氣態離子，搭配質譜儀器分析線蟲蛋白質圖譜，透過光譜的差異區分不同線蟲 (Perera *et al.* 2005)或幼蟲、成蟲的判斷 (Ahamad *et al.* 2012)。

分子生物學研究的快速發展，使學者得以開發以核醣體基因或粒線體基因核苷酸序列做為標記的鑑定方法 (Toumi *et al.* 2013; Avó *et al.* 2017)。現今，利用特定分子標記序列的特殊性，搭配專一性的 PCR 引子、限制酶、膠體電泳，使以核酸和聚合酶鏈鎖反應為基礎的偵測鑑定技術蓬勃發展。國際上已有針對根瘤線蟲、莖線蟲、根腐線蟲及松材線蟲等廣泛利用的多重聚合酶鏈鎖反應偵測技術 (multiplex PCR) (Zhuo *et al.* 2010; Hu *et al.* 2011; Jeszke *et al.* 2015; Dauphinais *et al.* 2018)。此外，快速、準確性及靈敏度皆高且成本相對低的恆溫圈環形核酸增幅法 (loop–mediated isothermal amplification, LAMP)，也於近年逐漸受到重視。該技術透過多組專一性引子同步增幅樣本內所帶之特定核酸，可搭配 hydroxy naphthol blue 染劑或偵測試紙的使用，於偵測反應的終端快速顯示偵測結果 (Ahuja & Somvanshi 2021)。目前，該技術已可用於偵測松材線蟲、根瘤線蟲、穿孔線蟲及小麥瘿腫線蟲等多種植物線蟲 (Bogale *et al.* 2020)。本研究團隊所開發的技術，甚至可自尚未產生病徵之人工接種水稻苗中成功偵測水稻葉芽線蟲 (李

等 2019)。除此之外，針對遺傳指紋所進行的分析技術亦應用於線蟲鑑識，如限制性片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism，RFLP)、增殖片段長度多型性 (amplified fragment length polymorphism，AFLP)、隨機擴增多態性去氧核醣核酸 (random amplification of polymorphic DNA，RAPD) 等。相關技術主要利用限制性內切酶切割複雜或重複的核酸，搭配 PCR 技術，分析不同個體所產生的片段差異，以區分物種。目前已有可應用於莖線蟲、包囊線蟲、根瘤線蟲等屬的相關技術 (Toumi *et al.* 2013; Amarante *et al.* 2014 ; Mahmoudi *et al.* 2020)。此外，利用微電子、微機械等工業技術，在微小面積的基質上種植高密度的生物探針的微陣列晶片 (microarray、biochip)，是反應快速，分析靈敏度及專一性高的大量篩檢的工具。近年，本團隊與中興大學團隊的跨校合作研究，已證實生物晶片亦可以使用於線蟲鑑定，成功開發可用於鑑定穿孔線蟲、松材線蟲、椰子紅輪線蟲、馬鈴薯腐敗線蟲、菊花根腐線蟲等十數種檢疫有害線蟲的生物晶片。此技術若未來應用於邊境檢疫，將大幅縮短檢驗時間、加速相關作業流程。

我國現況與挑戰

身為 WTO 會員，於國際貿易盛行之當代，我國自國外輸入之農產品種類與數量日益擴增，有害生物隨輸入農產品而入侵之風險亦不斷增加。為強化有害生物之偵測鑑定工作，防檢局於民國 89 年成立「進口植物有害生物偵測鑑定計畫」，後續透過「邊境查驗檢出檢疫有害生物之整合鑑定及分析系統」計畫，整合及借重學術及試驗研究機關之專業人力及技術設備，配合防檢局各分局所執行之輸入植物檢疫，協助進行邊境截獲之有害生物診斷鑑定。防檢局轄區分局或檢疫站針對輸入植物或其產品進行抽樣，以高風險性有害生物之寄主植物及繁殖材料 (如種子、苗木、接穗、球莖等) 及栽培介質為抽樣檢測之重點對象。如無法鑑定或需精密技術及設備始能檢測或鑑定時，將樣品後送請學術試驗研究單位專家協助。

針對具有檢防疫重要性的植物線蟲，目前我國鑑主要採用型態鑑定與分子技術鑑定併行的鑑定方式。型態鑑定的作業程序包含首先將線蟲自採取的植物或植物產品樣本中分離，利用顯微鏡觀察線蟲特徵，拍照並進行顯微量測，再比對文獻資料。由於線蟲種類繁多且體型小，特徵微小需要透過顯微鏡觀察與量測，型態鑑定流程雖不繁瑣卻相當耗時，且高度倚賴參考文獻、檢索表之齊備性，以及扎實的經驗累積。型態鑑定亦受限於所分離得之線蟲齡期與性別需要成蟲才能具備所有鑑定特徵。採取分子生物技術進行鑑定時，則需進一步運用化學試劑萃取線蟲核酸，進行聚合酶鏈鎖反應偵測，或延伸進行克隆、轉殖，已完成定序分析等。分子鑑定步驟較多且細瑣複雜，執行人員須具備

充足的分子生物學與線蟲學知識，以便順利進行電泳膠圖判讀或完成正確的序列分析。

相對於其他微生物，全球植物線蟲相關研究學者的人數少，植物線蟲的生物學、系統發生學與分子生物學等資料，於國際間的公開資料庫中皆屬相當匱乏。許多歷史悠久的物種缺乏分子生物學資料，而亦有許多新被發現的物種尚未有完整的寄主範圍、地理分佈、生活史等資訊。我國對於植物線蟲分類鑑定人才培育的長久不慎重視，更導致現今具有相關技術與經驗的人才短缺，得以投入檢防疫鑑識相關工作之人力遠低於基本需求。此外，第一線鑑識單位往往欠缺高解析度高倍率的顯微鏡、溫度精準的核酸增幅反應儀、電泳槽、低溫冷凍櫃等基本硬體設備，平時亦無儲備鑑定所需之試劑，導致多數樣本需經過長時間儲藏後再運送至學術單位完成鑑定。學術單位人力的不穩定性，增添鑑定時效的不確定性。此外，時常遭遇樣本數量不足、保存過久、狀態不佳，而造成特徵比對困難、鑑定更加耗時的狀況，甚至影響最終鑑定的準確性。受限於資訊、資源、人力的局限性，欲於短時間內準確完成植物線蟲鑑定並釐清其揀防疫重要性，實屬不易。

未來，我國須儘速進行大量專業人才的培育以補足人力缺口，提升各單位儀器設備數量，並積極進行植物線蟲鑑識新技術之開發與應用。近年，機器學習技術與影像辨識分析技術的快速進展，也為線蟲鑑定提供新的選擇。透過人工智能辨識系統，短時間內可處理大量樣品中的物種辨識。無論是辨識複雜背景下的線蟲卵，亦或是混合樣品中多種不同線蟲的辨識，皆有成功報導的案例(Akintayo *et al.* 2018)。欲開發優良的人工智能辨識系統，則首先須由線蟲鑑識專家拍攝、蒐集大量不同物種的各部位影像，獨立盡行物種註釋，再將圖像結合恰當的演算法建構模型，並經過影像資料反覆訓練模型，提升其鑑識準確度。我國於人工智能辨識系統領域人才濟濟，倘若有充足資源並與植物線蟲學者專家通力合作，應可順利開發符合我國檢防疫需求之高效能植物線蟲鑑識系統。

參考文獻

洪元平。1959。臺灣稻葉白尖病。植保會刊 1(4): 104–109。

李婉均、余冠毅、陳思聿、梁瑀婕、鍾嘉綾、楊爵因。2019。恆溫圈環形核酸增幅偵測技術於水稻徒長病篩檢之適用性探討。植物醫學期刊 61: 11–19.

陳脈紀。1961。水稻線蟲心枯病之研究。中興大學農林學報 9, 10: 103–116。

曾顯雄、曾國欽、張清安、蔡東纂、嚴新富。2019。台灣植物病害名彙 5: 47, 51, 54, 56, 82, 180, 181 211, 233。中華民國植物病理學會。

Abad, P., J. Gouzy, J. M. Aury, P. Castagnone–Sereno, E. G. Danchin, E. Deleury, L. Perfus-Barbeoch, V.

Anthouard, F. Artiguenave, V.C. Blok, M. Cailaud, P. M. Coutinho, C. Dasilva, F. D. Luca, F. Deau, M. Esquibet, T. Flutre, J. V. Goldstone, N. Hamamouch, T. Hewezi, O. Jaillon, C. Jubin, P. Leonetti, M. Magliano, T. R. Maier, G. V. Markov, P. McVeigh, G. Pesole, J. Poulain, M. Robinson-Rechavi, E. Sallet, B. Ségurens, D. Steinbach, T. Tytgat, E. Ugarte, C. Ghelder, P. Veronico, T. J. Baum, M. Blaxter, T. Bleve-Zacheo, E. L. Davis, J. J. Ewbank, B. Favery, E. Grenier, B. Henrissat, J. T. Jones, V. Laudet, A. G. Maule, H. Quesneville, M. Rosso, T. Schiex, G. Smart, J. Weissenbach and P. Wincker. 2008.** Genome sequence of the metazoan plant–parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. Nat. biotechnol., 26(8), 909–915.

Ahmad F., J. Gopal and H.F. Wu. 2012. Rapid and highly sensitive detection of single nematode via direct MALDI Mass Spectrometry. Talanta 93:182–185.

Ahuja, A. and V. S. Somvanshi. 2021. Diagnosis of plant–parasitic nematodes using loop–mediated isothermal amplification (LAMP): A review. Crop Prot. 147:105459.

Akintayo A., G. L. Tylka, A. K. Singh, B. Ganapathysubramanian, A. Singh, and S. Sarkar. 2018. A deep learning framework to discern and count microscopic nematode eggs. Sci. Rep. 8:1–11.

Amarante M. R. V., C. C. Bassetto, J. H. Neves and A. F. T. Amarante. 2014. Species–specific PCR for the identification of *Cooperia curticei* (Nematoda: Trichostrongylidae) in sheep. J. Helminthol. 88:447–452.

Avó, A.P., T. J. Daniell, R. Neilson, S. Oliveira, J. Branco and H. Adão. 2017. DNA barcoding and morphological identification of benthic nematodes assemblages of estuarine intertidal sediments: Advances in molecular tools for biodiversity assessment. Front. Mar. Sci. 4:66.

Bogale, M., A. Baniya and P. DiGennaro. 2020. Nematode Identification Techniques and Recent Advances. Plants (Basel) 9:1260.

Castagnone–Sereno, P., E. G. Danchin, L. Perfus–Barbeoch and P. Abad. 2013. Diversity and evolution of root–knot nematodes, genus *Meloidogyne*:

new insights from the genomic era. Annu. Rev. Phytopathol. 51:203–220.

Carneiro, R. M. D. G, C. B. Gomes, M. R. A. Almeida, A. C. M. M. Gomes, and I. Martins. 2003. First record of *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 on kiwi in Brazil and reaction of different plant species. Nematologia Brasileira 27(2):151–158.

Carneiro, R. M., M. R. A. Almeida, E. T. Cofcewicz, J. C. Magunacelaya and E. Aballay. 2007. *Meloidogyne ethiopica*, a major root – knot nematode parasitising Vitis vinifera and other crops in Chile. Nematology, 9(5), 633–639.

Davis, E., and A. MacGuidwin. 2000. Lesion nematode disease. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094. PHI–I–2000–1030–02.

Dauphinais, N., M. Vandal, A. Gagnon, Gl Bélair, P. Véronneau and B. Mimee. 2018. Development and Application of a Multiplex qPCR Method for the Simultaneous Detection and Quantification of *Pratylenchus alleni* and *P. penetrans* in Quebec, Canada. Plant Dis. 102 970–976.

Elling, A. A. 2013. Major emerging problems with minor meloidogyne species. Phytopathology 103: 1092–1102.

EPPO, 2022. EPPO Global database. In: EPPO Global database, Paris, France: EPPO.

Esbenshade P.R. and A. C. Triantaphyllou. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 17:6–20.

Esbenshade P.R. and A. C. Triantaphyllou. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 22:10–15.

Evans, K. 1970. Longevity of males and fertilization of *Heterodera rostochiensis*. Nematologica 16:369–374.

Goodey, T. 1922. On the susceptibility of clover and some other legumes to stem–disease caused by the eelworm, *Tylenchus dipsaci*, syn. devastatrix Kühn. J. Agric. Sci. 12:20–30.

Granger, J. 1964. Factors affecting control of the eelworm diseases. Nematologica 10: 5–24.

Hawn, E. J. 1963. Transmission of bacterial wilt of alfalfa by *Ditylenchus*

dipsaci (Kihn). Nematologica 9: 65–68.

Hawn, E. J. and M. R. Hanna. 1967. Influence of stem nematode infestation on bacterial wilt reaction and forage yield of alfalfa varieties. Can. J. Plant Sci. 47: 203–208.

Hollis, J. P. and S. Keoboonrueng. 1984. Nematode parasites of rice. *in:* Plant and Insect Nematodes (Nickle, W. R. ed.) Marcel Dekker, New York, pp. 95–146.

Hu, M. X., K. Zhuo and J. L. Liao. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. Phytopathology 101: 1270–1277.

Jeszke, A., R. Dobosz and Obrępalska–Stęplowska. 2015. A fast and sensitive method for the simultaneous identification of three important nematode species of the genus *Ditylenchus*. Pest Manag. Sci. 71: 243–249.

Kimpinski, J. and R. Dunn. 1985. Effect of low temperatures in the field and laboratory on survival of *Pratylenchus penetrans*. Plant Dis. 69: 526–527.

Perry, R. N., M. Moens and J. L. Starr. 2009. Root – knot nematode. CAB International Publishers, Wallingford, UK, pp. 164–167.

Mahmoudi, N., E. N. Pakina, L. A. Limantceva and A. V. Ivanov. 2020. Diagnosis of potato rot nematode *Ditylenchus destructor* using PCR – RFLP. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries* 15:353–362.

de Man, J. G. 1876. Onderzoekingen over vrij in de aarde levende nematoden. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver. 2: 78–196.

de Man, J. G. 1880. Die Eingheimischen, frei in der reinen erde und im süssen wasser lebends Nematoden. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver. 5: 1–104.

Netscher C and A. Sikora. 1990. Nematode parasites of vegetables. *in:* Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture (Luc M., R.A. Sikora, and J. Bridge ed.). CAB International Publishers, Wallingford, UK, pp. 237–283.

Nyczepir, A. P. and J. O. Becker. 1998. Fruit and citrus trees. Plant and Nematode Interactions 36:637–684.

Pablo, C. and V. Nicola. 2007.

Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Brill, Leiden, The Netherlands.

Perera M. R., V. A. Vanstone, M. G. K. Jones. 2005. A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix – assisted laser desorption/ionization time–of–flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 19:1454–1460.

Prasad, J. S., M. S. Panwar and Y. S. Rao. 1987. Nematode problems of rice in India. Tropical Pest Management 33:127–136

Sikora R.A. and N. Greco. 1990. In: M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge (Eds.), Plant–parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CAB International Publishers, Wallingford, UK, pp. 181–235.

Širca, S., G. Urek and G. Karssen. 2004. First report of the root – knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato in Slovenia. Plant Dis. 88:680.

Singh B. 1953. Some important diseases of paddy. Agriculture and Animal Husbandry, Uttar Pradesh, 3:27–30.

Singh, U.B. and D. N. Garg. 1949. New and unknown diseases of rice in the United Provinces. Plant Protection Bulletin 1:1

Smiley, R. W. 2009. Root – lesion nematodes reduce yield of intolerant wheat and barley. Agronomy Journal 101:1322–1335.

Spears, J. F. 1968. The golden nematode handbook, survey, laboratory, control and quarantine procedures. U.S. Dept. Agr. Handbook, 353.

Stoyanov, D. 1964. Bioekologicheski prouchvanija na st'blenata nematoda po luka–*Ditylenchus* all (Beijerinck). Gradinarska i Lozarska Nauka 1: 63–71.

Toumi, F., L. Waeyenberge, N. Viaene, A. Dababat, J. M. Nicol, F. Ogbonnaya and M. Moens. 2013. Development of two species–specific primer sets to detect the cereal cyst nematodes *Heterodera avenae* and *Heterodera filipjevi*. Eur. J. Plant Pathol. 136:613–624.

Towson, A. J. and B. Lear. 1982. Effect of Temperature on Reproduction and Motility of Pratylenchus vulnus. J. Nematol. 14:602–603.

Turner, D. R. and R. A. Chapman. 1972. Infection of Seedlings of Alfalfa and

Red Clover by Concomitant Populations of *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus penetrans*. J. Nematol. 4:280–286.

Valette, C., D. Mounport, M. Nicole, J. L. Sarah and P. Baujard. 1998. Scanning electron microscope study of two African populations of *Radopholus similis* (Nematoda: Pratylenchidae) and proposal of R. citrophilus as a junior synonym of *R. similis.* Fundamental and Applied Nematology 21:139–146; 16.

Whish, J., J. Thompson, T. Clewett, J. Lawrence and J. Wood. 2014. *Pratylenchus thornei* populations reduce water uptake in intolerant wheat cultivars. Field Crops Res. 161:1–10.

Yuksel, H. S. 1960. Observations on the life cycle of *Ditylenchus dipsaci* on onion seedlings. Nematologica 5: 289–296.

Zakrzewski, J. 1977. Studies on the occurrence, biology and pathogenicity of stem nematode (*Ditylenchus dipsaci* Kühn) on red clover in Poland. 1. Biology of stem nematode. Hodowla Rosin Aklimatyzacja i Nasiennictwo 21: 313–320.

Zhuo, K., M. Luo, R. Cui, and J. L. Liao. 2010. A multiplex one – step PCR method for the simultaneous identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. doui* three species within the xylophilus group. For. Pathol. 41:66–69.

The Present Situation and Challenges for Diagnostics and Detection of Plant Nematodes with Quarantine Importance in Taiwan

Meng-shan Hsieh[1] and Jiue-in Yang[1,*]

[1]Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei city, Taiwan

Abstract

Plant-parasitic nematodes are a large group of animals with diverse morphology, biological characteristics, and ecological niches. They are microscopic, highly reproductive, strongly adaptative to environments, could easily be transported by agricultural trades, and are almost impossible to eradicate once they enter and establish in an area. They cause serious yield losses in global agricultural crops and forests and change the landscape drastically, thus being considered a very important biological factor in international trades. Being a member of the World Trade Organization, Taiwan imports many agricultural commodities at huge quantities. Thus, the risk of accidentally importing pests is also high. In the current regulations for Taiwan’s plant and plant product importation, *Ditylenchus angustus, Radopholus similis* and *Globodera rostochiensis* are plant nematode species listed as the associated quarantine pest to prohibited entry plant or plant products, while *D. dipsaci* and D. destructor are associated to restricted entry plant or plant products. In addition, 54 plant–parasitic nematode species are listed as regulated quarantine pests. At the border, BAPHIQ randomly samples the importing plant or plant products, identifies the intercepted pests within, and conducts proper quarantine measures. In this article, we review the relating regulations, introduce the important nematode spices, the diagnostic and identification methods and techniques, and discuss the present situation and

*Corresponding author.
E-mail: jiueinyang@ntu.edu.tw

challenges for the system in Taiwan. Both morphological and molecular identification methods are being applied for quarantine nematode pest diagnostic and identification. However, the insufficient biological information, resources, and lacking professional manpower is limiting both efficiency and efficacy. In the future, Taiwan needs to investigate more resources in training more professionals, upgrading necessary equipment, and fully supporting the development and application of new methods for plant quarantine nematode identification.

Keywords: Plant quarantine, Plant-parasitic nematode, Diagnostic and detection methods